云　南　植　物　研　究　2010，**32**(6)：489～494
Acta Botanica Yunnanica　　DOI：10.3724/SP.J.1143.2010.10128

夏块菌与青刚栎形成外生菌根形态变化的研究

胡弘道[1]，苏开美[2*]，柴红梅[2]

(1 国立台湾大学森林环境暨资源学系，台湾 台北；2 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所，云南 昆明　650223)

摘要：夏块菌（*Tuber aestivum*）是一种具有较高经济价值的菌根食用菌。对夏块菌与青刚栎（*Cyclobalanopsis glauca*）在形成菌根过程中不同阶段的菌根形态变化进行了研究，结果显示：用夏块菌孢子液接种青刚栎苗后，第14天起开始形成淡乳色的外生菌根，外延菌丝刚毛状；第一至第二个月可形成黄褐色、褐色外生菌根，外延菌丝刚毛或羊毛状。外生菌根为单根，长1～4 mm，直径150～250 μm。菌套厚12～20 μm，平坦或自菌根延伸出刚毛状菌丝，外延菌丝束黄绿色；哈替氏网菌丝直径1～1.5 μm。菌根老化后变暗褐或萎缩。外延菌丝束呈黄绿色是夏块菌菌根区别于其它块菌菌根最重要的形态特征。

关键词：块菌科；菌根合成；显微结构；半无菌苗；共生真菌

中图分类号：Q 934　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0253-2700(2010)06-489-06

Study on the Morphological Changes of the Ectomycorrhizae Formed by *Tuber aestivum* on *Cyclobalanopsis glauca* Seedlings

HU Hung-Tao[1], SU Kai-Mei[2*], CHAI Hong-Mei[2]

(1 *School of Forestry and Resource Conservation*, *National Taiwan University*, Taipei, Taiwan; 2 *Institute of Biotechnology & Germplasmic Resource*, *Yunnan Academy of Agricultural Sciences*, Kunming 650223, China)

Abstract: *Tuber aestivum* is a valuable edible symbiotic fungus. The aim of this study was to investigate the morphological changes after the ectomycorrhizae of *Cyclobalanopsis glauca* seedlings and *T. aestivum* were formed. The results showed *T. aestivum* formed bristle ectomycorrhizae on the rootlet tip with light cream color on *C. glauca* seedlings on the 14th day by inoculating liquid spores suspension. It formed either typical yellowish brown to brownish ectomycorrhizae with or without bristles or woolly ectomycorrhizae after inoculation in one to two months. Ectomycorrhizae were monopodial, 150－250 μm in diameter and 1－4 mm in length. The fungus mantle was 12－20 μm thick, surface smooth or with bristles, or with extramatrical hyphae. Hyphae in Hartig nets were 1－1.5 μm in diam. The ageing mycorrhizae became dark brown, wilted and shrunken. The yellowish green extramatrical mycelial strands could be the most important morphological character to distinguish the mycorrhizae formed by *T. aestivum* and those formed by other *Tuber* species.

Key words: Tuberaceae; Ectomycorrhizae systhesis; Micro-structure; Semi-aseptic seedling; Symbiotic fungi

夏块菌（*Tuber aestivum* Vittad.）（图1：A，B）是一种价值很高的食用共生真菌，成熟时具芳香味，在食用菌市场有相当重要的前景。外形上，夏块菌与黑孢块菌（*T. melanosporum*）都呈黑色，子囊果表面的多角形疣突也十分相似，不易分辨；但夏块菌表面的疣突明显比黑孢块菌的大，而且其孢子成熟后呈橄榄黄色，表面具不规则的宽大网纹，而黑孢块菌成熟后的孢子

* 通讯作者：Author for correspondence；E-mail：kaimei@sina.com
收稿日期：2010-07-02，2010-10-09 接受发表
作者简介：胡弘道（1948－）男，从事森林土壤及菌根食用菌的研究。E-mail：hungtao@ntu.edu.tw

呈黑色，表面具刺状纹饰，因此，二者仍容易区分。夏块菌主要生长于石灰质土壤中，常与壳斗科及松科植物形成外生菌根关系（胡弘道，1987；Harley and Smith，1983；Palenzona，1969；Zambonelli 等，2000），主要分布在中欧及西班牙（胡弘道，2010；Cetto，1978；Moreno 等，1991）、英国（Pegler 等，1993）、瑞典（Weden 等，2004）、中国（陈娟等，2005）等国家的温带气候区。在意大利，夏块菌子实体的最早成熟期在每年 5 月中旬，8～10 月为其盛产期，在 10～12 月出现的夏块菌，由于其芳香味较浓及孢子网格数的少许不同与形成菌根形态的少许差异，有些真菌学者曾将其作为不同的分类单元（*T. uncinatum*）来描述（Zambonelli 等，2000）。目前基于分子生物学的系统发育研究表明：*T. uncinatum* 是 *T. aestivum* 之同物异名（Paolocci 等，2004）。

半人工栽培是培育夏块菌的有效措施。同种类的块菌与同一宿主所形成的外生菌根形态有时不易区分，即使是同一菌种与同一宿主所形成菌根，其质与量也受环境因子影响（Marx 等，1989）。所以，在培育块菌苗的过程中，定期检查菌根是否遭受污染非常重要，这对以后子实体的形成影响极大。本研究旨在确定夏块菌与青刚栎（*Cyclobalanopsis glauca*）在形成外生菌根过程中的各种形态变化，建立块菌菌根苗是否被污染的显微检测方法，为实现夏块菌人工栽培提供科学基础，为夏块菌园的科学管理提供参考。

1 材料和方法

1.1 半无菌苗的培育

将青刚栎种子用 30% H_2O_2 杀菌 50 min 后，用无菌水清洗种子直至无 H_2O_2 的气味，即时播种至已经高温、高压（121℃，1.5 kg/cm^2）灭菌，内含无菌介质［4 号蛭石与泥炭苔，比例 1∶1（v/v）］的盆钵（18 cm×19 cm）中，将此盆钵置于温室中培养，培养期间用无菌水浇润介质，经 10～20 d 后，种子陆续发芽，待苗木 1 个月大时即可供移植用。

1.2 穴植管苗的培养

将上述 1 个月大小的青刚栎苗，移植到用干净透明胶片包裹、内含已经高温、高压处理过的 4 号蛭石与泥炭苔（1∶1 v/v）介质中，旋转置入内径为 3.9 cm、长 19 cm 的黑色穴植管，将此穴植管放入日温 20～25℃、夜温 18～20℃的自然光照玻璃温室内培养，培养期间每一穴植管共加 100 ml 无菌 MMN 营养液（Marx，1968），用无菌水浇润介质使维持在田间容水量。经培养约 2 个月后，苗木根系已大部分长至介质外围时，即进行接种。

1.3 菌根接种

每株苗木根系周围用滴管或注射针筒加 10 ml 采购自意大利夏块菌子实体（图 1：A）所制成的孢子悬浮液（孢子悬浮液浓度约为 12 000 个孢子/ml），共接种 50 株，培养期间用无菌水浇润介质。

1.4 菌根观察及照相

自接种后开始每隔 3～4 d 取出苗木，将根系直接放在 20～40 倍的立体显微镜下观查菌根的形成状态及变化，记录其特征并照相。

1.5 观察菌根在扫描式电子显微镜（SEM）的形态

将典型的外生菌根用小镊子取下，用超音波清洗器洗净后，菌根在载玻片上固定后进行观察。扫描电子显微镜（SEM）照相参照文献（胡弘道，1987）进行。





图 1 夏块菌子实体表面与具白色菌脉的产孢组织

A. 产自意大利（San Miniato）；B. 产自四川省会东县

Fig. 1 The ascocarp surface and gleba of *Tuber aestivum*

A. San Miniato，Italy；B. Huidong County，Sichuan Province

2 结果与分析

2.1 菌根特征

夏块菌接种青刚栎后从开始形成菌根至菌根萎缩的整个过程的形态变化如图 2、图 3 所示。接种后的第 14 天已形成明显可见的淡乳白色具刚毛状外延菌丝的外生菌根（图 2：A），于第一个月时可见已形成棒状的菌根及自菌套（fungus mantle）延伸出的外延菌丝（extramatrical hyphae，图 2：B），于第二个月时可见许多黄褐或黄绿色自根上长出的外延菌丝与菌丝束

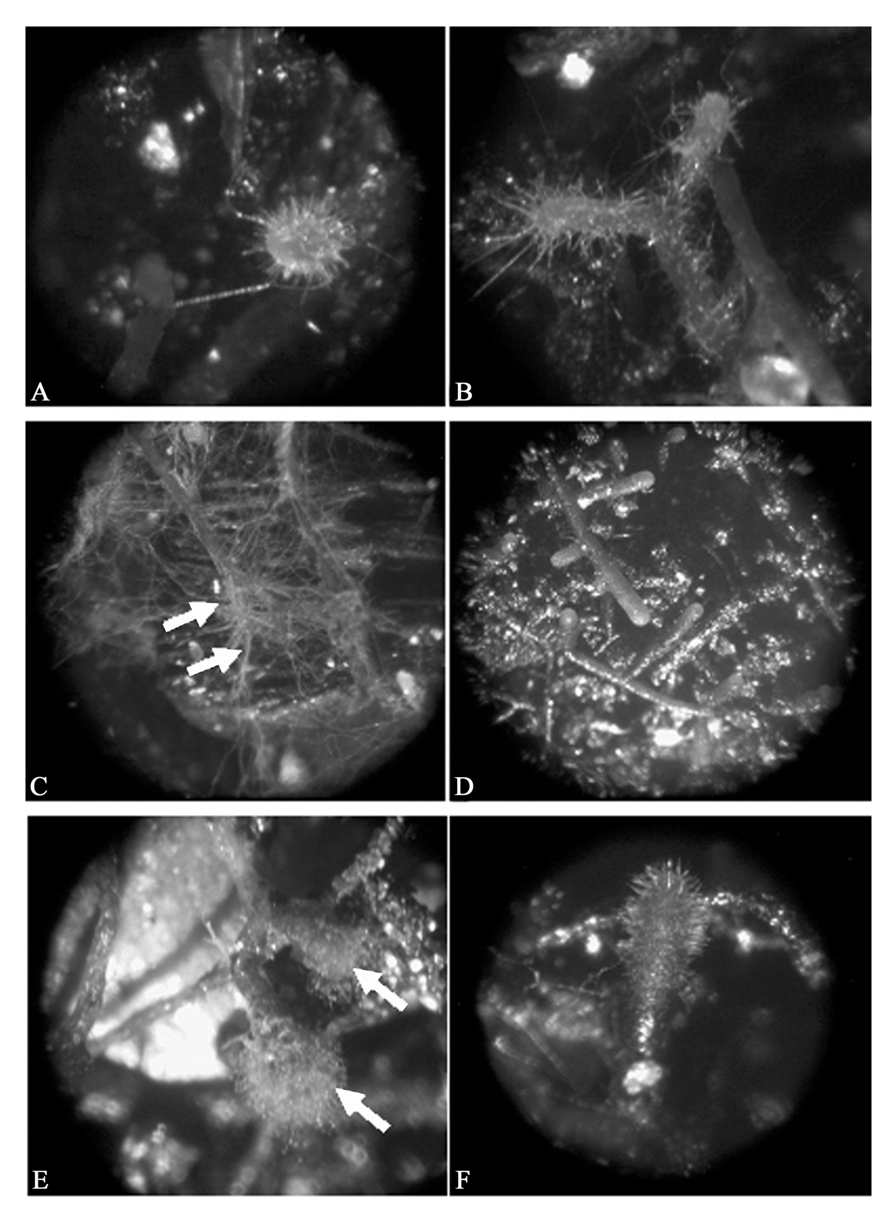


图 2 夏块菌菌根形态

A. 接种后 14 d 的菌根形态（×45）；B. 接种后 30 d 的菌根形态（×30）；C. 接种 2 个月后的菌根体外菌丝（箭头指处、×12）；D. 接种 1～2 个月后形成的羽状外生菌根（×15）；E. 接种 2 个月后形成的羊毛状外生菌根（箭头指处、×25）；F. 接种 1～2 个月后形成具刚毛的外生菌根（×30）

Fig. 2 The mycorrhiza morphology of *T. aestivum* formed on *C. glauca*

A. The mycorrhiza morphology in 14 days after inoculation (×45); B. The mycorrhiza morphology in 30 days after inoculation (×30); C. The external hyphae (as arrows pointed) of mycorrhizae in two months (×12); D. The pinnate mycorrhiza type in 1－2 months after inoculation (×15); E. The woolly mycorrhizae (as arrows pointed, ×25) in 2 months after inoculation; F. The mycorrhiza with setaes (×30) in 1－2 months after inoculation

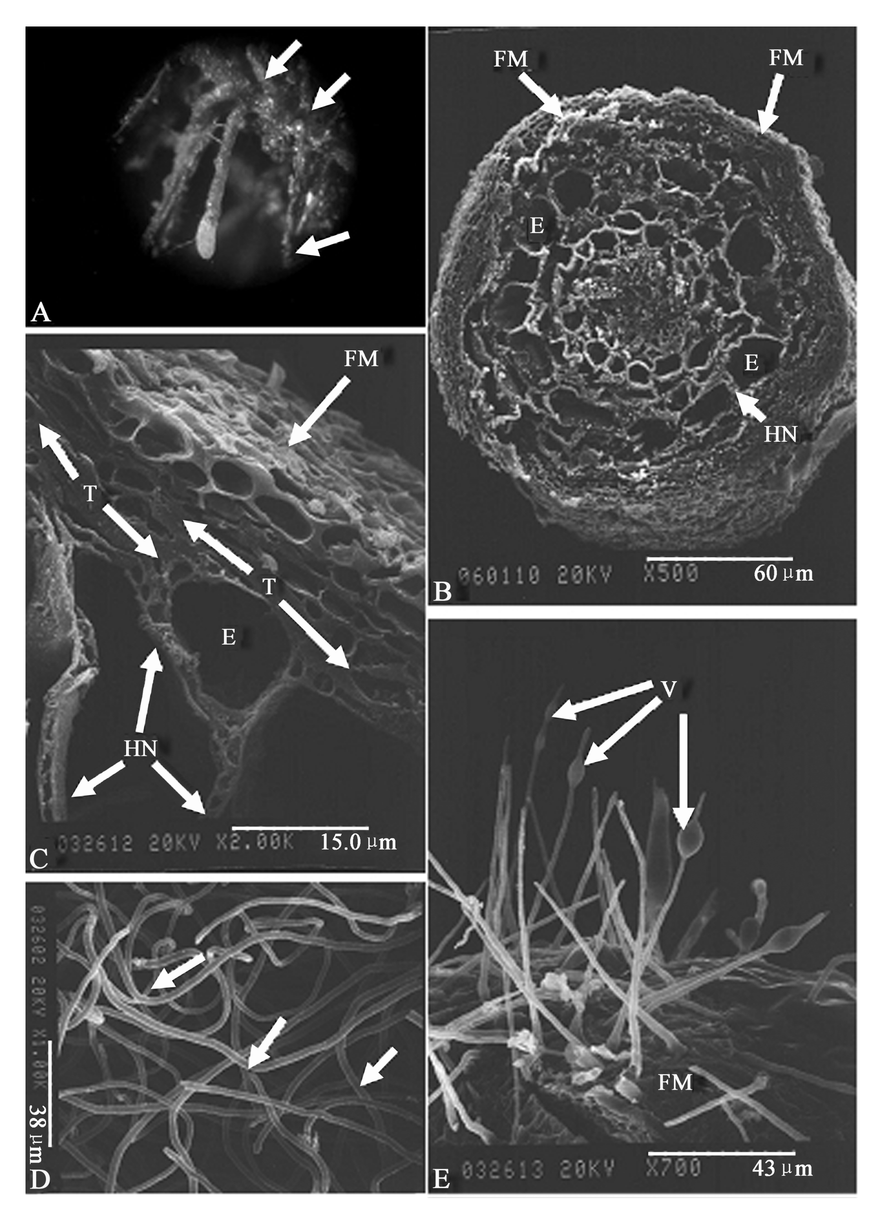


图3 夏块菌菌根形态

A. 夏块菌与青刚栎的老化外生菌根（箭头指处、×12）；B. 夏块菌与青刚栎形成外生菌根的横切面（箭头所示 FM＝菌套、HN＝哈替氏网）；C. 夏块菌与青刚栎形成外生菌根的纵切面（箭头所示：FM ＝菌套、HN＝哈替氏网、E＝根表皮细胞、T＝单宁层）；D. 夏块菌形成羊毛状菌根的体外延伸菌丝呈波浪状（箭头指处）；E. 夏块菌自菌套（FM）延伸出的刚毛（setae）及刚毛菌丝间的囊状体（V、箭头所示）

Fig. 3 The mycorrhiza morphology of *T. aestivum* formed on *C. glauca*

A. The ageing ectomycorrhizae (arrow, ×12); B. Cross section of ectomycorrhiza (Fm＝fungus mantle, HN＝Hartig net, as arrows pointed respectively); C. Longitudinal section (FM＝fungus mantle, HN＝Hartig nets, E＝epidermis, T＝Tannin layer, as arrows pointed respectively); D. Wavy-like curves of external hyphae formed by woolly ectomycorrhiza (arrows pointed); E. The setae extended from the fungus mantle and the vesicles between the seta (arrow pointed)

(mycelial strands，图 2：C 箭头所示)。开始形成的菌根都是单根的（monopodial），于接种后的第二个月逐渐可见规则或不规则的羽状菌根（图 2：D），其菌根有的是平滑的，有的具半透明黄褐色刚毛（图 2：F）状外延菌丝，有的具羊毛状外延菌丝。具羊毛状外延菌丝的菌根（图 2：E）在接种的第一个月后就能观察到，其自菌根延伸出的菌丝为黄褐色、呈卷曲波浪状（图

3：D 箭头指处）。自菌根形成 9 个月后可见暗褐色及萎缩的菌根（图 3：A 箭头指处）。单根的菌根长 1～4 mm，菌套厚在 12～20 μm 之间（图 3：B）、为薄壁细胞、在接近根表皮细胞处可见有单宁层（图 3：C），自菌套延伸出的刚毛具或不具囊状体（图 3：E 箭头所示），囊状体皆位于刚毛菌丝间；哈替氏网菌丝直径 1～1.5 μm、哈替氏网可达第二层皮层细胞间隙（图 3：C）。

3　讨论

从夏块菌孢子液接种到青刚栎根周围后的第 5 天起，每隔 1 天对苗木根系的感染状况进行观察，确认有菌根形成后，每隔 3～4 天将根系直接放在 20～40 倍的立体显微镜下观察新菌根的形成及菌根的变化。根据夏块菌接种的文献报告所述（胡弘道，1987；胡弘道等，2007；Palenzona，1969；Weden 等，2004；Zambonelli 等，2000），将观察到有与其相同菌根形态者一一记录、照相，并对所有苗木已感染形成菌根者进行相互对比，排除由外界污染源所形成的菌根。本研究发现：在接种后的第 14 天开始形成半透明乳白色具刚毛状外延菌丝的菌根尖，此半透明乳白色的外生菌根与以黑孢块菌（*T. melanosporum*）、波奇块菌（*T. borchii*）、印度块菌（*T. indicum*）及意大利白块菌（*T. magnatum*）为接种源时形成的初始的菌根（胡宝元和刘启福，2008；Zambonelli 等，2000）在形态上非常相似。因此，区别这些块菌的菌根，必需经一至二个月后再观察菌根形态才能从中确认是否受到污染。倘若菌根尖初始是乳白色或近似白色，随着时间的推移，整个根也逐渐变成白色菌根，则可确定此白色菌根是污染的菌根。随着菌根根尖的生长，夏块菌的乳白色菌根的菌丝颜色逐渐会变为浅黄至黄褐色并逐渐有延伸菌丝形成（图 2：A），有些延伸菌丝再经一至二个月后，如在气温接近 20℃及土壤湿润时，延伸的菌丝束会由淡黄褐色变成黄绿色（图 2：B），如气温在 25℃以上则只能看到黄褐色的延伸菌丝束，此具绿色的菌丝束不曾在其它块菌接种后的菌根有过报告，因此可作为夏块菌菌根的最重要判断依据。

用夏块菌接种后一个月所形成的外生菌根是淡褐色平滑的、羊毛状（图 2：E）或完全是刚毛状的（图 2：F），此三者之菌根形态，亦能在以台湾块菌、印度块菌及黑孢块菌接种所形成的菌根出现（胡弘道，2010；胡宝元和刘启福，2008；胡弘道等，2007；Zambonelli 等，2000）。本研究虽未计算羊毛状菌根出现的频率占所有菌根型频度之百分率，但从观察结果可知，羊毛状菌根是较常出现的菌根型，这是判断夏块菌菌根的重要线索。羊毛状菌根延伸出的菌丝呈明显的波浪状（图 3：D），由扫描电镜（SEM）所看到的菌丝表面是平滑的。菌根刚毛呈半透明的黄褐色，这与印度块菌、台湾块菌、黑孢块菌等的刚毛颜色不易区分；刚毛具囊状体或不具囊状体（vesicle 图 3：E），囊状体大都位于刚毛间，这与意大利白块菌所形成的菌根具刚毛者相同（陈怡君，2004），然而，除台湾块菌外，尚未见由其它黑色块菌所形成刚毛菌根的菌丝中有囊状体的报道（胡弘道，2010；Zambonelli，2000）。

在菌套（fungus mantle）与根表皮细胞间有单宁层形成（图 3：C），这是一种抵抗真菌和昆虫入侵的行为（Haering 等，2008；Coley，1986）。自菌套延伸到土壤的菌丝或菌丝束越多，对宿主的养分及水分吸收越有利（Bowen，1973）。因此，夏块菌菌根苗栽培到较干燥与贫瘠土壤时，可能比外延伸菌丝较少的黑孢块菌、意大利白块菌（胡宝元和刘启福，2008；陈怡君，2004）更具竞争力。

〔参　考　文　献〕

陈怡君，2004. 意大利白块菇之半无菌菌根合成与不同 pH 介质对其菌根形成与叶部大量养分元素之效应［D］. 台北：国立台湾大学森林研究所（硕士论文）

胡弘道，1987. 块菇与林木共生关系之研究（II）4 号块菇之特征及其与夏块菇之菌根合成［J］. 台大实验林研究报告，**1**（3）：17—26

胡弘道，2010. 块菌（松露）之培育与食谱［M］. 台北：国立编译馆

Bowen GD，1973. Mineral nutrition of ectomycorrhizae［A］. In：Marks GC，Kozlowski TT eds. Ectomycorrhizae—Their Ecology and Physiology［M］. London：Academic Press

Cetto B，1978. Der grosse Pilzfuehrer（Band 2）［M］. Muenchen：BLV Verlagsgesellschaft

Chen J（陈娟），Liu PG（刘培贵），Wang Y（王云），2005. Notes on *Tuber aestivum*（Tuberaceae，Ascomycota from

China [J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), **27** (4): 385—389

Coley PD, 1986. Costs and benefits of defense by tannins in a neotropical tree [J]. *Oecologia*, **70**: 238—241

Haering DA, Huber MJ, Suter D *et al*., 2008. Plant enemy-derived elicitors increase the foliar tannin concentration of *Onobrychis viciifolia* without a trade-off to growth [J]. *Annals of Botany*, **102** (6): 979—987

Harley JL, Smith SE, 1983. Mycorrhizal Symbiosis [M]. London: Academic Press

Hu HD (胡弘道), Huang JY (黄镜谚), Sheng WQ (沈伟强) *et al*., 2007. Effects of different temperature on the mycorrhiza formation and growth of two truffle species synthesized with *Cyclobalanopsis glauca* (Qerst.) Seedlings [J]. *Quartely Journal of the Experimental Forest of National Taiwan University* (台大实验林研究报告), **2** (1): 65—77

Hu BY (胡宝元), Liu QF (刘启福), 2008. Ectomycorrhizal diversity of *Tuber melanosporum* Vittadini Formed on *Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Qerst [J]. *Quartely Journal of the Experimental Forest of National Taiwan University* (台大实验林研究报告), **259: 22** (1): 55—60

Marx DH, 1969. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria [J]. *Phytopathology*, **59**: 153—163

Marx DH, Cordel CE, Maul SB *et al*., 1989. Ectomycorrhizal development on pine by *Pisolithus tinctorious* in bare-root and container seedling nurseries. I. Efficacy of various vegetative inoculum formulations [J]. *New Forest*, **3**: 45—56

Moreno G, Galan R, Montecchi A, 1991. Hypogeous fungi from peninsular Spain [J]. *Mycotaxon*, **42**: 201—238

Palenzona M, 1969. Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Corylus avellana* L. [J]. *Allionia*, **15**: 121—131

Paolocci F, Rubini A, Riccioni C *et al*., 2004. *Tuber aestivum* and *Tuber uncinatum*: two morphotypes or two species? [J]. *FEMS Microbiology Letters*, **235**: 109—115

Pegler DN, Spooner BM, Young TWK, 1993. British Truffles: A Revision of British Hypogeous Fungi [M]. Kew: Royal Botanic Gardens

Weden C, Chevalier G, Danell E, 2004. *Tuber aestivum* (Syn. *T. uncinatum*) Biotopes and their history on Gotland, Sweden [J]. *Mycological Research*, **108** (3): 304—310

Zambonelli A, Rivetti C, Percudani R *et al*., 2000. Tuber Key: A delta-based tool for the description and interactive identification of truffles [J]. *Mycotaxon*, **75** (1): 57—76